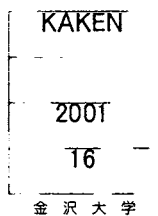


RNAポリメラーゼサブユニット5を介した転写活性化機構と新規転写補助因子RMP

著者	村上 清史
著者別表示	Murakami Seishi
雑誌名	平成13(2001)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1999-2001
ページ	11p.
発行年	2002-03
URL	http://doi.org/10.24517/00050057





RNAポリメラーゼサブユニット5を介した 転写活性化機構と新規転写補助因子RMP

(課題番号：11480200)

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤(B)(2))
研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 村上 清史

(金沢大学工学部研究所教授)

金沢大学附属図書館



8011-05258-6

は し が き

研究組織

研究代表者 村上清史 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学)
研究分担者 野村孝弘 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学)
研究分担者 林 直之 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学)
(研究協力者 Wei Wenxiang 金沢大学大学院医学研究科大学院生)

研究経費

平成 11 年度	4,600 千円
平成 12 年度	3,200 千円
平成 13 年度	3,200 千円

研究のまとめ

我々は、B 型肝炎ウイルス(HBV) X 蛋白(HBx)の宿主標的として RNA ポリメラーゼサブユニット 5 (RPB5)を見い出した。HBx は、RPB5 と転写基本因子 TFIIB と相互作用し、転写補助活性化能(coactivator)を示すことを見い出した(J. Biol. Chem., 1998)。また、RPB5 と結合し HBx に機能的に転写抑制補助能(corepressor)を示す新規蛋白 RMP (RPB5-mediating protein)を同定した (Mol. Cell. Biol., 1998)。最近の RNA ポリメラーゼ II (Pol II)の結晶モデルの報告は、RPB5 が転写制御蛋白との接触面として機能する可能性が提示された。

本研究の成果として、1) と RAP30 と RAP74 を用いて in vitro で再構成した基本転写因子 TFIIF が精製組み換え型 RPB5 と特異的に結合することを見い出した。各々の欠損型変異蛋白を用いた in vivo 及び in vitro の結合実験により、RAP30 と RPB5 の中央部が両者の結合に寄与している結果を得た。RAP30 の中央部をアラニン置換でスキャンした結果、Y124 と Q131 残基が TFIIF 中の RAP30 と RPB5 結合に必須な残基として特定された。培養細胞内で内在性 Pol II は野生型の RAP30 を含む TFIIF と会合したが RAP30 の Y124A 又は Q131A 変異を持つ TFIIF とは会合せず、転写過程での Pol II と TFIIF の会合に RAP30 と RPB5 の結合が重要であることを示した(J. Biol. Chem., 2001)。

2) 精製組み換え型 RPB5 が in vitro で、2 重鎖 DNA セルロースカラムと特異的に結合することを見い出した。この結合には RPB5 の exposed ドメインが必要であった。RPB5 の中央部の集約型アラニン置換変異を用いた結果は、少なくとも離れた 2 ケ所のアミノ酸配列が、次いで点置換アラニン変異を用いた解析から、4 アミノ酸残基が DNA 結合能に必須である結果を得た。その内 T111

及び S113 の 2 残基は分子の外側に位置し、DNA との接触に直接寄与すると示唆された。他の 2 つのバリン残基(V74, V82)は分子の内部にあり、分子構造の維持を介して DNA 結合に寄与していることが推定された。結晶モデルで 2 つのプロリン残基(P80, P120)の寄与が予測されたが、我々の解析ではこれらの残基の影響を認めなかった。

3) RMP は細胞質と核に共に見い出された。RMP の欠損変異等を作成し、GFP 融合型を用いて、RMP の細胞内局在を検討した。C 端側にある核移行シグナル(NLS)と N 端側に今回見い出した coiled coil ドメインの細胞質局在シグナル(CLS)の両者が、RMP の細胞内局在を決定している(投稿準備中)。RMP の coiled coil ドメインを他の蛋白と融合させると、核蛋白の TFIIB の局在が細胞質に変わるので、RMP の coiled coil ドメインは独立して、CLS 機能を示す。細胞内の coiled coil ドメインの結合パートナーの存在が示唆された。

4) RPB5 との相互作用の局面で、HBV X 蛋白に拮抗する新規蛋白 RMP の機能解析を目的として、酵母 Two-hybrid 法で RMP に相互作用する蛋白を選択した。その結果、RMP 自体が単離され、in vitro 及び培養細胞系で homomeric な相互作用を確認した。繰り返し単離された候補 cDNA は、DNA メチル化に関わり corepressor 機能が報告されているクローンであった。培養細胞で異なるタグ標識したこの蛋白と RMP を発現させた系で、両者の特異的結合が認められた。両者の結合の転写への影響の検討が今後に残された(投稿準備中)。

HBV X 蛋白(HBx)は細胞質及び核に存在し、宿主の多様な因子との相互する多機能制御蛋白である。HBV 関連肝細胞がんの発症に HBx の関与が示唆されているが、その作用実態は明らかでない(Intervirology, 2000, J. Gastroenterol., 2001)。HBx の核内標的である RPB5 は、活性化転写に重要な役割を担っていることが酵母系で報告された。我々が見い出した RPB5 の DNA 結合能は配列非特異的と推定される。この DNA 結合能が、転写制御因子との相互作用によって修飾される可能性の検討が残されている。更に、RPB5 と TFIIF 及び RPB5 と HBx の結合は相互に競合的である予備的な結果があるので、HBx が転写の特定の段階で TFIIF の作用を遅延させる可能性が推定される。

研究発表

1) 学会誌等で発表

1. T. Nomura, Y. Ling, D. Dorjsuren, S. Ohno, T. Yamashita, S. Murakami. Human Hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells, and active for transactivation. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1453:330-340.
2. Yul, DY., Moon, HB., Son, JK., Jeong, SK., Yu, SL., Yoon, H., Han, YM., Lee, CS., Park, JS., Lee, CH., Hyun, BH., Murakami, S., Lee, KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in the transgenic mice expressing hepatitis B virus X-protein. (1999) *J. Hepatol.* 31:123-132..
3. Ohno, H, Kaneko, S, Lin, Y, Kobayashi, K, Murakami, S. Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of nuclear factor for IL-6 through its basic-leucine zipper domain. (1999) *J. Med. Virol.*, 58, 11-18.
4. S-W. Kee, Y. M. Lee, S-K. Bae, S. Murakami, Y. Yun, K-W. Kim. Human Hepatitis B Virus X protein is a possible mediator of hypoxia induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268:456-461.
5. Kenkichi Masutomi, Shuichi Kaneko, Naoyuki Hayashi, Tatsuya Yamashita, Yukihiro Shiota, Kenichi Kobayashi, and Seishi Murakami. Telomerase Activity Reconstituted *in Vitro* with Purified Human Telomerase Reverse Transcriptase and Human Telomerase RNA Component. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275: 22568-22573.
6. Wei, W., Dorjbal, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N., Murakami, S. Direct interaction between the subunit RAP30 of TFIIF and RNA polymerase subunit 5 (RPB5) which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 276:12266-12273, 2001.
7. Qin, W., Yamashita, T., Shiota, Y., Lin, Y., Wei, W., Murakami, S. Mutational analysis of the structure and functions of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology*, 33:728-737, 2001.

8. Arai, K., Masutomi, K., Khurts, S., Kaneko, S., Kobayashi, K., Murakami, S. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for their oligomerization and telomerase activity. *J. Biol. Chem.* In press, 2002.
9. Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita Y., Murakami, S. Oligomeric interaction of Hepatitis C Virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem., J Biol Chem.*, 277:2132-2137, 2002.
10. Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., Murakami, S. Hepatitis C Virus NS5A Binds RNA-Dependent RNA Polymerase NS5B and modulates RdRP activity. *J. Biol. Chem.* In press, 2002.
11. S. Murakami. Hepatitis B Virus X Protein: Structure, Function and Biology. (1999) *Intervirol.*, 42:82-99 .
12. Murakami, S. Hepatitis B Virus X protein:A multifunctional regulatory protein. *J Gastroenterol.* 36:651-660, 2001.
13. 村上清史 B型肝炎ウイルス X 蛋白の発現と機能 生化学 71:1309-1326. (1999)
14. 村上清史. B型肝炎ウイルス(HBV)の遺伝子制御 (1999) p227-233, ウイルス肝炎一最新情報、メデイコピア 39、亀田治夫、山中学、河合忠、飯野四郎編.
15. Dorjsuren D., 村上清史. (2000) B型肝炎ウイルス(HBV) X タンパクに拮抗する新規タンパク RMP. *実験医学* 18:1137-1141
16. 増富健吉、村上清史. (2000) 昆虫細胞発現系を用いたヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現・精製。 *バイオインダストリー*、17:35-42.
17. 村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現・精製とヒトテロメラーゼ活性の試験管内の再構成. *教育通信*、(前)。23:24-25, 2001.
18. 村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現・精製とヒトテロメラーゼ活性の試験管内の再構成. *教育通信*、(後)。24:22-23, 2001.

2) 国内外の学会等発表

- (1) D. Dorjsuren, Y. Lin, WX. Wei, T. Yamashita, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami. RMP, a novel RNA polymrase subunit 5-interacting protein, couteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. 2nd Kanazawa International Symposium on Cancer. 1999. Feb.24 at Kanazawa.
- (2) N. Hayashi, S. Murakami. STM1, which encodes a binding protein of G:G quadruplex DNA, is invoved in telomere structure and DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*.A meeting on Telomere and Telomerase at Cold Spring Harbor Laboratory.
- (3) Y. Shiota, T. Yamashita, Q.Weiping, S.Kaneko, K. Kobayashi, and S. Murakami. Hepatitis C Virus NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NA5B and augments the RdRP activity. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (4) S. Murakami, T. Yamashita, Y. Shiota, W. Qin, Y. Lin, TBS. Yen, S. Kaneko. Transacting activity of hepatitis C virus NS5B. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (5) W.Qin, T. Yamashita, Y. Shiota, S. Murakami. Effect of alanine scanning mutants on the properties of Hepatitis C Virus NS5B.6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (6) T. Yamashita, Kaneko. S., Y. Shiota, M. Hirano, W. Qin, Y., S. Murakami, The new region which affects subcellular localization of Hepatitis C Virus NS5B. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (7) S. Murakami, W. Wei, Y. Yang, Y. Lin, T. Nomura, D. Dorjbal. Transacctivation and coactivation functions of Hepatitis Virus X protein.The molecular biology of Hepatitis B Viruses 1999 at Santa Cruz.
- (8) W. Wei, D. Dorjbal, Y. Lin, Y. Yang, S. Murakami. RNA polymerase subunit 5, one of the targets of HBV X protein, interact with TFIIF.The molecular biology of Hepatitis B Viruses 1999 at Santa Cruz.

- (9) D. DORJSUREN, .WEI, Y. Lin, B. Dashnyam, N. Hayashi, and S. Murakami. RNA polymerase subunit 5 (RPB5) functions in activated transcription through interaction with TFIIB. Transcriptional regulation of eukaryotic cells at Cold Spring Harbor Laboratory.
- (1 0) K. Masutomi, K. Kaneko, N. Hayashi, T. Yamashita, Y. Shirota, K. Kobayashi, S. Murakami. Reconstituted telomerase activity of purified recombinant hTERT and hTR. Miami Symposium at 1999.
- (1 1) S. Murakami. A modulation mechanism of transcription by Hepatitis B Virus X protein. Lecture at 1999 at Foods and Drugs Administration at Bethesda, USA.
- (1 2) S. Murakami. Molecular functions of Hepatitis C Virus proteins. Lecture at 1999 at Medical University of Mongolia.
- (1 3) 山下竜也、代田幸博、村上清史、金子周一。HCV NS5B の細胞内局在に影響を与える領域の同定.第 3 5 回日本肝臓学会総会パラレルシンポ。
- (1 4) 村上清史。B 型肝炎ウイルス(HBV)X 蛋白による転写の修飾。日本癌学会シンポジウム『感染症と発がん』
- (1 5) 村上清史、ウエイウエンシャン、野村孝弘、ドルジスレンドルジバル B 型肝炎ウイルス X 蛋白のトランス活性化能と転写補助機能第 5 8 回日本癌学会総会。
- (1 6) 野村孝弘、ドルジスレン ドルジバル、山下竜也、代田幸博、村上清史 遺伝子導入したヒト B 型肝炎ウイルス X 蛋白は核でも観察される。第 5 8 回日本癌学会総会
- (1 7) W. Wei, D. Dorjbal, N. Hayashi, T. Nomura, S. Murakami Interaction of general transcription factor TFIIF and RNA polymerase subunit 5.第 5 8 回日本癌学会総会
- (1 8) D. Dorjbal, B. Dashnyam, W. Wei, T. Nomura, S. Murakami Corepression domain of RMP inhibits Hbx transactivation.第 5 8 回日本癌学会総会
- (1 9) W. Qin, T. Yamashita, Y. Shirota, S. Murakami. Mutational analysis of the

properties of Hepatitis C Virus NS5B 第23回日本分子生物学会総会、

(20) 林 直之、村上清史. 出芽酵母 STM1 遺伝子の S 期完了から M 期進行過程における機能第23回日本分子生物学会総会

(21) 村上清史、Lin Yong, Wei WenXiang, Dorjsuren Dorjbal. B型肝炎ウイルス X 蛋白の coactivator 能とトランス活性化能第23回日本分子生物学会総会

(22) K. Masutomi, S. Kaneko, N. Hayashi, T. Yamashita, Y. Shiota, K. Kobayashi, S. Murakami.. Telomerase activity reconstituted in vitro. 2000 Miami Symposium on Biotechnology. Feb. 3, 2000. Miami, U.S.A.

(23) S. Murakami. Structure and function of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)Lecture at 2000 at Univ. South California

(24) S. Murakami. Structure and function of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). Invited Lecture at Feb. 5, 2000 at Univ. South California

(25) W. Qin, T. Yamashita, S. Murakami. Molecular Characterization of HCV RNA Dependent RNA polymerase. Invited lecture at First National Conference “Mongolia towards molecular biology” At Sept.9, 2000 at Ulanbaataar Mongolia.

(26) L. Delgermaa, B. Dashnyam, L. Delgermaa, T. Nomura, D. Dorjsuren, Wx. Wei, S. Murakami. Function and subcellular localization of RPB5-mediating protein. Invited lecture at First National Conference “Mongolia towards molecular biology” At Sept.9, 2000 at Ulanbaataar Mongolia.

(27) K. Masutomi, K. Arai, and S. Murakami. Telomerase activity using purified recombinant human telomerase reverse transcriptase (hTERT).Pusan-Kanazawa International Symposium Sept. 26, 2000 at Pusan.

(28) S. Murakami. Biological Function and Structure of human telomerase reverse transcriptase. Invited lecture at Gwanju University at Sept. 27 in Korea.

(29) B. Dashnyam, L. Delgermaa, T. Nomura, D. Dorjsuren, Wx. Wei, S. Murakami. Subcellular localization of RMP, which counteracts HBx transactivation. At the 6th

Asian conference on transcription. Oct. 23-27, 2000, at Beijing China.

(30) W. Qin, T. Yamashita, H. Shirota, H. Luo, S. Murakami. Molecular Characteristics of HCV NS5B RNA Dependent RNA Polymerase. 7th International Conference on Molecular Biology of Hepatitis C Virus and related viruses.

(31) 増富健吉、金子周一、荒井邦明、林 直之、代田幸博、山下竜也、小林健一、村上清史。組み換え型ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現・精製と触媒酵素の再構成。第 59 回日本癌学会総会

(32) 平野正明、山下竜也、代田幸博、野村孝弘、林 直之、村上清史。C 型肝炎ウイルス(HCV)NS5B 蛋白と核小体蛋白 nucleolin の会合。第 59 回日本癌学会総会

(33) 秦 偉平、村上清史。HCV NS5B RNA 依存 RNA ポリメラーゼの 2 量体化。第 59 回日本癌学会総会

(34) W. Wei, D. Dorjsuren, T. Nomura, S. Murakami. Mutations of RAP30, a subunit of TFIIF, defects in interaction with human RNA polymerase II subunit 5. 第 59 回日本癌学会総会.

(35) Dashnyam, L. Delgermaa, D. Dorjsuren, T. Nomura, W. Wen, S. Murakami. Two regions of RNA polymerase II subunit 5-mediating protein (RMP) are important for the subcellular localization.第 59 回日本癌学会総会

(36) 林 直之、村上清史。出芽酵母のテロメア領域複製に関与する遺伝子の機能。第 23 回日本分子生物学会年会。

(37) W. Wei, D. Dorjsuren, Y. Lin, W. Qin, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami. Human general transcription factor IIF and RNA polymerase II through binding of RAP30 and RPB5.第 23 回日本分子生物学会年会。

(38) 荒井邦明、増富健吉、金子周一、小林健一、村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の多量体形成に関する検討。第 23 回日本分子生物学会年会。

- (3 9) W. Qin, T. Yamashita, Y. Shirota, T. Nomura, N Hayashi, H. Luo, S. murakami. Characterization of HCV NS5B RNA dependent RNA polymerase (RdRP).第 23 回日本分子生物学会年会。
- (4 0) B. Dashnyam, L. Delgermaa, D. Dorjsuren, T. Nomura, W. Wen, S. Murakami. Subcellular localization of RMP, a RNA polymerase II subunit 5- Mediating Protein. B. 第 23 回日本分子生物学会年会。
- (4 1) S. Murakami. Structure and Functions of HCV Replicating Enzyme, NS5B. 3rd Kanazawa International Symposium on Cancer. Jan. 10, 2001 at Kanazawa.
- (4 2) K. Arai, K. Masutomi, S. Kaneko, K. Kobayashi, S. Murakami. Analysis of homomeric interaction of human telomerase reverse transcriptase. Telomere and Telomerase. March 29 - April 1, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- (4 3) W. Wei, D. Dorjsuren, Y. Lin, S. Murakami. Direct interaction between RPB5 and RAP30 is critical for the association of RNA polymerase II and TFIIF.Mechanism of eukaryotic transcription Aug. 29-Sept2 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- (4 4) S. Zhang, W. Wei, L. Dergermaa, T. Le, S. Murakami. DNA-binding ability of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5). Mechanism of eukaryotic transcription Aug. 29-Sept2 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- (4 5) W. Qin, H. Luo, T. Yamashita, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural protein 5B (NS5B) is critical to RNA Dependent RNA polymerase. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and related viruses. Sept. 2-5, at Paris France.
- (4 6) M. Hirano, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, Y. Shirota, T. Nomura, K. Kobayashi, S. Murakami. Interaction between nucleolin and Hepatitis C Virus NS5B affects subcellular localization of the truncated NS5B. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and related viruses. Sept. 2-5, at Paris France.
- (4 7) S. Murakami Hepatitis C Virus RNA replication enzyme. Kanazawa International Symposium on Cancer (KISC) III. Jan. 11, 2001 at Kanazawa.

(48) ウエイ ウエンシャン、デルゲルマ ジュフサンジャフ、レイ ツイ、林 尚之、野村孝弘、村上清史。RNA ポリメラーゼサブユニット5 (RPB5)と RAP30 の結合は、TFIIF と RNA ポリメラーゼ(Pol II)の会合に関与する。第 60 回日本癌学会総会。

(49) チン ウエイピン、ルオ ホン、島上哲朗、村上清史。C 型肝炎ウイルス(HCV)非構造蛋白 5B (NS5B)のオリゴマー化は RNA 依存 RNA 合成酵素(RdRP) 活性に必須である。 第 60 回日本癌学会総会。

(50) 荒井邦明、増富健吉、フルツ シラガルデイ、金子周一、小林健一、村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の多量体形成に関する検討。第 60 回日本癌学会総会。

(51) S. Zhang, W. Wei, L. Dergermaa, T. Le, N. Hayashi, S. Murakami. Human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5) exhibits DNA-binding ability. 第 24 回日本分子生物学会年会

(52) H. Luo, W. Qin, Y. Ma, T. Shimakami, N. Hayashi, S. Murakami. Dimerization of Hepatitis C Virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase.第 24 回日本分子生物学会年会

(53) 林 尚之、野村孝弘、作本直子、向 由起夫、金子嘉信、原島 俊、村上清史。出芽酵母の protein phosphatase knock-out series を用いた細胞老化形質の解析。第 24 回日本分子生物学会年会

(54) 荒井邦明、増富健吉、フルツ シラガルデイ、金子周一、小林健一、村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の多量体形成に関する検討。第 24 回日本分子生物学会年会